Lane Medical Library

Zur Kenntnis der Toxinbildung

des

Bacterium avicidum.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

veterinär-medizinischen Fakultät

an der Universität Bern

vorgelegt von

Valentin Stang,

approb. Tierarzt aus Niederbronn im Elsass.

Karlsruhe i. B.
Chr. Fr. Müller'sche Hofbuchdruckerei
1901.

Zur Kenntnis der Toxinbildung

des

Bacterium avicidum.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

veterinär-medizinischen Fakultät

an der Universität Bern

vorgelegt von

Valentin Stang,

approb. Tierarzt aus Niederbronn im Elsass.

Karlsruhe i. B.
Chr. Fr. Müller'sche Hofbuchdruckerei
1901.

Meiner lieben Mutter

sowie

dem Andenken meines teuren Vaters

in Dankbarkeit gewidmet.

Von der Fakultät auf die Empfehlung von Herrn Prof. E. Levy in Strassburg und den Antrag von Herrn Prof. A. Guillebeau zum Drucke genehmigt.

Bern, den 27, Juni 1901.

Der Dekan:
Dr. Guillebeau.

Aus dem Institut für Hygiene und Bakteriologie
der Universität Strassburg.

Der Erreger der Geflügelcholera, das *Bakterium avicidum*, war der erste Mikroorganismus, bei dem es gelang, mit Hilfe löslicher giftiger Stoffwechselprodukte ein typisches Krankheitssymptom zu erzeugen, das sonst nur durch die Infektion mit lebenden Bazillen hervorgerufen wird. Pasteur[1]) fand diese hochwichtige Thatsache bei seinen grundlegenden Arbeiten über Schutzimpfung. Er ging mit der Absicht um, mit Hilfe von bazillenfreien Kulturflüssigkeiten Hühner gegen Geflügelcholera zu immunisieren, und hierbei fand er das Merkwürdige, dass er mit dem durch Passieren von Chamberlandkerzen von jedem lebenden Krankheitserreger befreiten Kulturmedium vorübergehend ein charakteristisches Symptom der genannten Krankheit, nämlich die Schlafsucht, erzeugen konnte. Er schildert dies mit folgenden Worten:

„Lorsqu'on injecte sous la peau d'une poule neuve en très bonne santé l'extrait d'une culture filtrée du microbe . . . . la poule prend la forme

[1]) Comptes rendues d. l'acad. d. sci. 1880, pag. 1030.

en boule, reste immobile, refuse de manger et éprouve une tendance au sommeil des plus prononcées, comme dans le cas de maladie par inoculation du microbe. La seule différence consiste en ce que le sommeil est plus leger que dans la maladie reelle, la poule se réveille au moindre bruit.“

Mit keimfreien Filtraten vermochte also Pasteur beim Huhn, wenn er 120 ccm auf 2 ccm eingeengt und subkutan injiziert hatte, Schlafsucht zu inscenieren, ein Symptomenbild, das eben so ausgesprochen war, wie wenn er die Tiere mit vollvirulenten Kulturen geimpft hatte; die Tiere wurden unbeweglich, kauerten sich in Form einer Kugel zusammen, und zeigten eine unüberwindliche Neigung zum Schlafen. Als charakteristisch hebt Pasteur hervor, dass sie im Gegensatz zu den mit Bazillen infizierten, eine gesteigerte Reflexerregbarkeit aufwiesen, sodass sie beim leisesten Geräusch aus dem Schlaf aufzuwecken waren. Dieser Zustand dauerte circa vier Stunden und verschwand dann langsam, bis das Tier wieder das Aussehen eines normalen angenommen hatte. Pasteur schliesst aus diesen Versuchen:

„que pendant la vie du parasite, il se fait un narcotique, qui provoque le symptôme morbide si prononcé du sommeil dans la maladie du cholera des poules“.

Er nimmt also in dem Filtrat das Vorhandensein eines Narkotikum an, welches das Krankheitssymptom bei den Tieren hervorruft, oder wie man es heute bezeichnet, das Vorhandensein eines Toxins.

Dies war das erste Mal, dass es gelungen ist, bei Bakterien ein spezifisches Gift nachzuweisen. Seitdem hat man bei einer Reihe von Mikroorganismen ihre Fähigkeit, Gifte zu bilden, näher studiert, und so ist der Versuch Pasteurs der Ausgangspunkt geworden für die ganze moderne Lehre von den Bakterientoxinen und für die einschneidendste therapeutische Entdeckung auf dem Gebiete der Medizin, für die Antitoxintherapie, für die Heilserumtherapie, welche in der Human- und Veterinär-Medizin bei Diphtherie und Tetanus ihre schönsten Erfolge aufzuweisen hat.

Unter den Bakteriengiften unterscheidet man nach den neuesten Lehrbüchern — ich halte mich bei diesen Angaben an das zuletzt erschienene, an den „Grundriss der klinischen Bakteriologie von E. Levy und F. Klemperer“ [2]), in dem diese ganzen Verhältnisse sehr übersichtlich geschildert sind — zwei Gruppen. Zur ersten gehören diejenigen Bakterien, welche ein lösliches Gift bilden, das ohne Schwierigkeit in die Kulturflüssigkeit übergeht. Diese Gifte, die man ganz einfach dadurch erhält, dass man Bazillenkulturen durch Chamberlandkerzen filtriert, erzeugen nun, subkutan oder intravenös den Tieren einverleibt, das typische Krankheitsbild. Die Repräsentanten dieser Gruppe sind Diphtherie- und Tetanusbazillen, sowie der in neuerer Zeit gefundene Erreger der nervösen Form von Fleischvergiftung, die Bazillen des Botulismus. Die Gifte dieser Gruppe sind dadurch ausgezeichnet, dass sie in minimalen Mengen die Tiere zu Fall bringen. So vermag man sich unter Umständen

beim Tetanusbazillus ein Toxin herzustellen von derartiger Wirksamkeit, dass 1 ccm 40 Millionen Gramm weisse Mäuse in kürzester Zeit tötet; das von Behring so genannte Tetanus-Normalgift (Tet N T 1) weist eine derartige Toxicität auf (1 ccm Tet N T 1 = + 40 000 000 g M).

In die zweite Gruppe der Bakteriengifte haben wir diejenigen zu rechnen, welche nicht in die Kulturflüssigkeit übergehen, sondern nur in den Körpern der Bakterien selbst sich befinden. Als Hauptvertreter dieser haben wir anzusehen: Typhusbazillen und Choleravibrionen, sowie die auch für die Tierpathologie wichtige Gruppe des Bacterium coli. Zuerst hat R. Pfeiffer[3]) diese Gifte dargestellt durch Abtöten von Agarkulturen mittels Chloroform oder durch vorsichtiges Erhitzen der Kulturen bis etwas über ihre Abtötungstemperatur hinaus (gewöhnlich 10 bis 60 Minuten bei 56° C.). Von diesen Giften braucht man aber weit grössere Mengen, um den Tod der Versuchstiere herbeizuführen; so z. B. mussten wir nach hiesigen Versuchen bei einem sehr virulenten Colistamm immer noch eine Öse von 1,9 mgr Inhalt einer 24 stündigen Agarkultur, bei 56° abgetötet, einer weissen Maus einspritzen, um dieses Tierchen zu töten. Diese Gifte haben noch die Eigenschaft, dass sie gleich nach der Einverleibung ihre Wirkung beginnen, während bei den löslichen Toxinen eine gewisse Latenzperiode, ein Inkubationsstadium, ihrer Wirkung vorangeht. Abgesehen von diesen beiden spezifischen Bakterien-

[3]) Deutsche medizin. Wochenschrift 1894, Nr. 48.

giftarten hat man durch besondere Behandlung der Kulturen noch giftige Substanzen gewonnen, welche von Buchner mit dem Namen Bakterienprotëine belegt wurden. Während die spezifischen Toxine bei längerem Erwärmen auf 65° vernichtet werden, ertragen diese Protëine sogar Siedehitze, ausserdem scheinen sie bei sehr vielen Bakteriensorten identisch erhalten werden zu können und ziehen bei Versuchstieren nie typische Symptome, sondern nur Fieber und Leukocytose nach sich.

Um nun wieder auf die Pasteurschen Versuche zurückzukommen, so ist bei den Giften, die er aus Filtraten von Geflügelcholerakulturen vorfand, vor allem folgendes in die Augen springend:

1. Es muss auffallen, dass mit den Giften es nur gelungen ist, ein einziges Symptom der Krankheit, die Schlafsucht, nicht aber das ganze Krankheitsbild selbst hervorzurufen. Die Tiere erholen sich, bleiben leben; dass sie nicht die Krankheit selbst durchgemacht haben, zeigt sich besonders auch dadurch, dass sie bei späterer Impfung mit virulenter Kultur prompt erlegen sind, es hatte also die vorhergegangene Injektion der löslichen Stoffwechselprodukte keine Immunität gezeitigt.

2. Pasteur musste, um das eine Krankheitssymptom zu gewinnen, zu verhältnismässig kolossal grossen Quantitäten von Kulturflüssigkeit greifen. Er engte 120 ccm bei niederer Temperatur ein und

spritzte dann die ganze grosse Menge jedesmal einem einzigen Tiere ein. Wenn wir damit die Mengen vergleichen, die z. B. bei Tetanus genügen, um den tötlichen Starrkrampf der Versuchstiere zu erzeugen, so müssen wir die Dosis des Geflügelcholerakulturfiltrats als ausserordentlich hoch bezeichnen. — Gelingt es doch bei dem tetanusimmunen Huhn mit 30 ccm Tetanusbouillonfiltrat die natürliche Immunitätsbarriere zu sprengen und das Tier an typischem Starrkrampf erkranken zu lassen (F. Klemperer[2]). In dem Pasteurschen Präparat war demnach das eigentliche Krankheitsgift nur in sehr geringer Menge vorhanden.

Merkwürdiger Weise sind die Pasteurschen Versuche nicht eingehend verfolgt worden. Nur eine Bestätigung des einen Befundes Pasteurs liegt vor, und zwar von Salmons[4]). — Leider war mir dessen Originalarbeit trotz aller Mühe nicht zugänglich, deshalb muss ich mich auf das von Pasteur in seiner oben erwähnten Arbeit Geschriebene beschränken. — Unter anderem weist auch Kruse in dem Flüggeschen „Handbuch der Mikroorganismen" darauf hin, dass die Toxine der Geflügelcholera bis jetzt noch nicht eingehend studiert sind. Es nimmt uns diese Thatsache umsomehr wunder, da doch das Bakterium avicidum, abgesehen von seiner grossen praktischen Bedeutung, auch ein nicht zu unterschätzendes theoretisches Interesse darbietet. Wir wollen nur an seine Ähnlichkeit mit

[4]) Referiert von Kitt: W. u. Uw. d. S.

dem Pestbazillus und an seine Stellung im botanischen System der Bakterien erinnern.

Beim Betrachten der von Pasteur gemachten Beobachtungen drängen sich uns noch eine Reihe von Fragen auf; so ist z. B. noch immer nicht entschieden, ob wir in seinen Stoffwechselprodukten des Bakterium avicidum wirklich lösliche Toxine oder eventuell intracelluläre Gifte, die erst beim Zerfall der Bakterienleiber in die Kulturflüssigkeit übergehen, vor uns haben. Um über einen Teil dieser Verhältnisse wenigstens einige Klarheit zu erhalten, bin ich der Aufforderung meines hochverehrten Lehrers, Herrn Professor E. Levy, dem ich für die Anregung und stetige wohlwollende Förderung der Arbeit herzlichst danke, gerne gefolgt und habe versucht die Punkte aus diesem Thema, auf die es hauptsächlich ankam, zu bearbeiten. Bei meinen Versuchen ging ich von einer Kultur aus, welche ich mir selbst aus einem an Geflügelcholera verendeten Huhn gezüchtet hatte. Im Mai 1900 war in einem Gehöft in Lothringen genannte Krankheit ausgebrochen, eingeschleppt nach den angestellten Recherchen durch italienisches Geflügel. Eine grössere Anzahl von Hühnern erlag unter typischen Symptomen der Seuche, und eines der gefallenen Tiere wurde dem Institut für Hygiene und Bakteriologie der Universität Strassburg zur Untersuchung eingesandt. Die von mir vorgenommene Sektion zeigte hämorrhagische Enteritis und Pericarditis; aus den Organen und dem Blut liessen sich durch Kultur und durch das Tierexperiment Bazillen

isolieren, die in allen Punkten mit dem Erreger der Geflügelcholera übereinstimmten. Es lag mir nun daran, trotz der hohen Virulenz, welche sie besassen, die Virulenz der gewonnenen Reinkulturen noch weiter in die Höhe zu treiben. Dies erreichte ich in kurzer Zeit dadurch, dass ich sie mehrere Male den Körper von Tauben passieren liess, der nächst folgenden Taube immer eine geringere Quantität injizierend. Im einzelnen giebt folgende Tabelle Aufschluss:

Tabelle I.

Taube No.	Datum 1900	Körpergewicht gr	Geimpft mit ccm	Stirbt nach Stunden	Anzahl der Bakterien
I.	28. V.	348	0,01	12	?
II.	30. V.	350	0,001	15	?
III.	1. VI.	337	0,0001	20	?
IV.	3. VI.	353	0,00001	20	118
V.	5. VI.	351	0,000001	21—22	5
VI.	7. VI.	331	0,0000001	—	—

Hierbei interessierte es mich, zumal in den letzten Versuchen, zu sehen, wie viele Bakterien ausreichen, um den Tod des Tieres herbeizuführen. Mit Hilfe der von Forster auch in unserem Institute eingeführten geaichten Ösen und Spiralen stellte ich mir in gewöhnlicher Bouillon (Löfflersche) die Verdünnungen her. Durch Zählplatten kontrollierte ich die eingebrachte Menge und fand so, dass ganz wenige, wenn nicht vielleicht ein einziger Bazillus genügt,

die Krankheit und den Tod des Tieres in Scene zu setzen. Dies steht im Einklang mit früheren Untersuchungen von Schönwerth[5]), die mir bisher noch nicht bekannt waren. Auch ihm war es gelungen, mit ganz wenig Bakterien, zeitweise mit 1—2 Exemplaren, typische Geflügelcholera an Tauben hervorzurufen, nachdem er seine Kulturen durch häufige Tierpassagen zu hoher Infektionstüchtigkeit gebracht hatte. Ich hatte also, wie Tabelle I zeigt, die höchst mögliche Virulenz auch bei dem mir selbst gezüchteten Stamm erzielt. Dieselbe wurde durch Wiederimpfen von Tauben auf ihrer Höhe erhalten, und ich konnte nun daran gehen, den eigentlichen Pasteurschen Versuch zu wiederholen und später zu modifizieren.

Es wurden zu dem Zwecke Bouillonkolben von je 100 ccm Inhalt mit einer Öse Herzblut einer soeben an Geflügelcholera verendeten Taube geimpft und verschieden lange Zeit bei einer Temperatur von 37° wachsen gelassen. Diese Kulturen wurden dann durch Chamberlandkerzen unter Überdruck von 2—3 Atmosphären filtriert und auf diese Weise 80 ccm Filtrat gewonnen, das nachher im Vacuum-Destillierapparat bei einer Temperatur von 28°—35° bis auf 1—2 ccm eingeengt wurde. Die so erhaltene syrupähnliche Masse wurde alsdann einer Taube mittelst Pravazscher Spritze intramuskulär einverleibt. Vorher hatte ich mich selbstverständlich von der Reinheit der Bouillonkultur, sowie von der Bakterienfreiheit des Filtrats durch Überimpfen grösserer Mengen vergewissert.

[5]) Schönwerth, Arch. f. Hyg., Band XVII, 1893, S. 361.

Mit geringen Unterschieden stellte sich auf die Injektion hin ein Symptomenbild ein, welches sich dem von Pasteur beschriebenen in den meisten Punkten sehr ähnlich verhielt. So war z. B. das Benehmen einer Taube, mit viertägigem Kulturfiltrat geimpft, folgendes:

12^{35} h. Injektion.

12^{45} h. Das Tier drängt gegen die Rückwand des Käfigs.

12^{50} h. Verlangsamtes und häufiges Niederschlagen der Augenlider.

1^{00} h. Starke Neigung zum Schliessen der Lider — jedoch beim geringsten Geräusch wacht die Taube auf, reckt den Kopf hoch, verfällt aber sofort wieder in den früheren Zustand.

1^{30} h. Das Tier macht einen kranken, schläfrigen Eindruck. Das Gefieder liegt nicht mehr glatt an, einzelne Federn sträuben sich. Der Kopf ist in die Schultern eingezogen. Der Schwanz steht nicht mehr gerade aus. Die Augen bleiben die meiste Zeit geschlossen, nur ab und zu werden die Augenlider hochgezogen.

2^{00} h. Das Gefieder ist vollkommen gesträubt, der Schwanz hängt nach unten, gleichsam als sollte er den Körper stützen. Das ganze Tier gleicht mehr einer Kugel.

Futteraufnahme wird verweigert, dagegen Wasser genommen.

2^{30} h. Vollkommener Schlaf, aber auch jetzt bewirkt das kleinste Geräusch ein Aufwachen.

3^{00} h. Desgleichen. — —

Dieses Bild, das schon zwei Stunden nach der Injektion in Erscheinung trat, blieb während der

Taube 3—4 Stunden nach der Injektion.

folgenden Stunden; die Schlafsucht wird immer stärker, jedoch die geringste Bewegung des Beobachters lässt das Tier aus dem schlafsüchtigen Zustande auf einige Momente wieder munter werden. Erst spät, gegen 10 Uhr abends, scheint auch die Reflexerregbarkeit nachzulassen; das Tier sitzt sehr apathisch da, und reagiert nur noch auf stärkere Geräusche. Kurz vor 12 Uhr nachts fand ich das Tier schwer und heftig atmend, die Flügel waren weit ausgespreizt und hoben sich ab und zu zu einem matten Schlag, die Atemnot

wurde stärker, mehrere Versuche sich zu erheben, fielen negativ aus und wenige Minuten später lief aus dem weit geöffneten Schnabel flüssiger Mageninhalt, dann folgten noch 4—6 kurze Inspirationen ehe der Tod vollständig eingetreten war. Die vorseitig beigegebene Abbildung veranschaulicht eine Taube in oben beschriebenem Schlafzustande.

Unmittelbar an den Tod des Tieres schloss sich die Sektion an. Dieselbe war in Bezug auf pathologisch-anatomische Gewebsveränderungen völlig resultatlos. Nur an der Impfstelle zeigte sich im Muskel eine rötliche Verfärbung. Das umliegende Gewebe war zum Teil blutig infiltriert. Weder in den zahlreichen mikroskopischen Präparaten, noch auf den Kulturen und Platten, welche aus Herzblut, Milz und aus der Impfstelle angelegt waren, liessen sich irgendwelche Bakterien nachweisen.

Die weiteren Versuche sind im einzelnen folgendermassen verlaufen:

Taube VII, 338 gr schwer, erhält 80 ccm auf 2 ccm eingeengtes Chamberlandfiltrat einer 48stündigen Bouillonreinkultur bei 37° gewachsen. Beginn der Schlafsucht nach 30—40 Minuten; Dauer derselben bis zum Tode, der nach 20—22 Stunden erfolgt. Sektion: keine pathologische Veränderung, Kulturen steril.

Taube VIII, 375 gr schwer, geimpft mit 80 ccm Chamberlandfiltrat einer 4tägigen bei 37° gewachsenen Reinkultur, wird nach 15 Minuten schläfrig, stirbt nach 11½ Stunden. Sektionsbefund negativ. Kulturen steril.

Taube IX, 375 gr schwer, werden 3 ccm als eingeengter Rest von 80 ccm Filtrat einer 8tägigen Reinkultur, bei 37° gewachsen, injiziert. Schlafsucht tritt nach 20 Minuten ein, der Tod erfolgt nach 18 Stunden. Kulturversuch und Sektion völlig negativ.

Taube X, 380 gr schwer, hat 80 ccm Chamberlandfiltrat, auf 2,5 ccm eingeengt, von **26** tägigen bei 37° gewachsenen Bouillonreinkulturen erhalten, sie wird erst nach einer Stunde sichtlich müde, erholt sich tags darauf und wird wieder vollkommen gesund. Nur stösst sich nach einiger Zeit an der Injektionsstelle ein ca. 1 Markstück grosser Hautteil ab.

Aus diesen Versuchen konnte ich also einwandsfrei darlegen, dass in allen Kulturen giftige Stoffwechselprodukte vorhanden sind, welche imstande waren, Tauben nach Injektion des eingedampften Restes von 80 ccm Chamberlandfiltrat in einen schlafsüchtigen Zustand zu versetzen und unter Umständen sogar den Tod der Tiere hervorzurufen. Nur Taube X, welche 26tägige Kulturen erhalten hat, blieb leben, aber auch die Schlafsucht trat bei diesem Tiere später auf, als bei allen andern. Zur Kontrolle wurden Tauben mit 2–3 ccm Vacuumrest von normaler Bouillon geimpft und zwar erhielt:

Taube XI (365 gr) den Rest von 80 ccm und

Taube XII (358 gr) den Rest von 150 ccm. Keines der beiden Tiere wurde schlafsüchtig, wie die mit Kulturfiltrat geimpften. Taube XI (80 ccm) starb zwei Tage später. Mikroskopische Präparate sowie Kulturen aus dem Herzblut liessen bacterium coli

erkennen. Taube XII, mit 150 ccm geimpft, blieb am Leben und völlig gesund. Wenn also auch diese eine Taube zu Grunde gegangen ist, so hat doch dieses mit dem Krankheitsbild der Geflügel-Choleratoxine nichts zu thun. Die Taube hat sich eine interkurrente Infektion mit bacterium coli zugezogen und ist daran verendet. Demgegenüber ist die zweite Taube, welche nahezu nochmal soviel eingedampfte Bouillon erhalten hat, nicht nur am Leben geblieben, sondern blieb auch in ihrem Allgemeinbefinden völlig normal. Es sind also, um mit Pasteur zu sprechen, die Toxine erst durch das Wachsen und den Stoffwechsel der Hühnercholerabazillen in der Bouillon entstanden.

Pasteur erwähnt in seiner Arbeit nicht, bei welcher Temperatur er seine Kulturen wachsen gelassen hat, doch dürfte anzunehmen sein, dass er Brutöfen mit einer Temperatur von 37° verwandte. Da aber im Taubenkörper eine ständige Temperatur von 41,5° bis 42° C. zu finden ist, so schien es mir interessant, auch einmal nachzusehen, ob ebenfalls bei dieser höheren Temperatur, vielleicht sogar in verstärkterem Maasse, Toxine gebildet werden. Zu dem Zwecke stellte ich mit bacterium avicidum-haltigen Herzblut geimpfte Bouillonkolben von 100 ccm Inhalt in Brutschränke von 42° C. Analog den Versuchen mit Kulturen, die bei 37° gewachsen waren, filtrierte ich die Bouillon durch Chamberlandfilter unter 2—3 Atmosphären Druck, engte das Filtrat im Vacuum bei niederer Temperatur (28° -34°) ein und injizierte damit intramuskulär:

Taube XIII, 360 gr schwer, 80 ccm einer **48** stündigen bei 42° gewachsenen Reinkultur. Nach 20 Minuten wird sie schläfrig und ist nach 24 Stunden noch sichtlich krank, erholt sich aber wieder und bleibt leben.

Taube XIV, 345 gr schwer, erhält 80 ccm **4**tägiger Bouillonkultur, bei 42° gewachsen und durch Chamberland filtriert. Schläfrigkeit tritt 10—15 Minuten nach der Injektion ein, abends scheint sie krank und stirbt ca. 30 Stunden nach der Impfung.

An den Organen zeigt sich bei der Sektion keine Veränderung. An der Impfstelle befindet sich ein circa kleinfingerlanger, etwa 1 cm breiter Sequester. Mikroskopische Präparate zeigen Detritus, zerfallene Zellen, rote Blutkörperchen, aber keine Bazillen. Kulturen bleiben steril.

Taube XV, 265 gr schwer, erhält Vacuumrest von 80 ccm **8**tägiger bei 42° gewachsener und durch Chamberland filtrierte Reinkultur. Nach 20 Minuten kauert sich das Tier zusammen und wird wenige Minuten später schläfrig, die Schlafsucht ist auch in der 27. Stunde von der Impfung an gerechnet vorhanden. Dreizehn Tage später stirbt das Tier. Das Körpergewicht beträgt nur noch 207 gr. Präparate und Kulturverfahren fallen negativ aus. Die Impfstelle ist von einem etwa markstückgrossen pergamentartigen Hof umgeben.

Taube XVI, 358 gr schwer, erhält 80 ccm eingeengtes Filtrat einer **27**tägigen bei 42° gewachsenen

Kultur. Schläfrigkeit sehr wenig ausgeprägt. Das Tier scheint aber doch etwas im Allgemeinbefinden gestört zu sein. Am Tage nach der Einspritzung völlig normales Verhalten. Die Taube bleibt leben.

Aus den Ergebnissen dieser Versuche lässt sich der Schluss ziehen, dass auch bei 42° Toxine gebildet werden, welche in Mengen von 80 ccm bei Tauben Schlafsucht und selbst auch Tod hervorrufen. Doch scheint die Toxicität der bei 42° gewachsenen Kulturen nicht so gross zu sein, wie die von Bakterien, welche im Brutschrank bei einer Temperatur von 37° gezüchtet sind. Schon in den Erlenmayerkolben zeigte sich im Wachstum bei den verschiedenen Temperaturen ein Unterschied. Während sich in der Bouillon von 37° schon nach wenigen Tagen am Boden ein ziemlich langer und dichter zopfartiger Niederschlag zeigte, der immer grösser wurde, war bei den im 42° Brutschrank wachsenden Bouillonkulturen nur ein geringer Bodensatz zu sehen und die vierwöchentliche Kultur schien nicht mehr Bazillen zu beherbergen, wie eine zweitägige von 37°. Einige der Kulturen wuchsen überhaupt erst nach einer zweiten Impfung.

Bis dahin hatte ich meine Versuche stets mit Bouillon angestellt, die aus Fett und sehnenfreiem Rindfleisch nach bekannter Methode angefertigt war. Pasteur hatte zu seinen Versuchen Hühnerbouillon genommen und so machte ich mich daran, auch in Hühnerbouillon die Toxine des bacterium avicidum zu studieren. Ich beschränkte mich den obigen Erfahrungen gemäss nur auf das Wachstum bei 37°,

zumal ich bei den Bouillonkolben, welche ich zu eventuellen Versuchen bei 42° wachsen liess, in Bezug auf den Bodensatz dieselbe Beobachtung machte, wie bei Löfflerscher Rindfleischbouillon. Um nicht allzu weitschweifig zu werden, sei es mir gestattet, kurz anzuführen, dass auch hiermit geimpfte Tauben nach Injektion von 80 ccm zwei-, vier-, acht- und 28tägigem eingeengten Kulturfiltrat typische Schlafsucht erhielten. Zu Grunde ging jedoch nur das Tier, welches vier- oder achttägige Kultur erhalten hatte.

Es zeigt sich damit, dass in der Hühnerbouillon ebenso grosse Mengen toxischer Stoffe gebildet werden, wie in der Rindfleischbouillon. Wenn ich nun meine Versuche mit den von Pasteur gemachten Beobachtungen vergleichen darf, so habe ich zunächst zu erwähnen, dass wie bei Hühnern auch bei Tauben Schlafsucht erzeugt werden kann, ja nach Injektion von Toxinen tritt nicht nur dieses Symptom der Krankheit auf, sondern dieselbe vermag auch den Tod der geimpften Tiere zur Folge zu haben. Wir sehen also im wesentlichen eine völlige Identität der Pasteurschen Befunde mit den meinigen, nur in dem einen Punkt besteht ein Unterschied, dass Pasteur nie den Tod der Versuchstiere erzielen konnte. Wenn man sich das zu erklären sucht, so muss man einmal auf die verhältnismässig sehr hohe Virulenz meines Bakterienstammes, die ich oben näher angegeben habe, zurückgreifen, andererseits sich daran erinnern, dass wir die weit kleineren und vielleicht empfänglicheren Tauben als Versuchstiere hatten, während Pasteur

Hühner benützte. Was bei Hühnern eine krankmachende Dosis darstellte, konnte bei den kleineren Tauben in den Bereich der tötlichen Menge fallen, und wenn wir somit die Dosen verschieden gross wählten, so mussten wir dazu gelangen, eine minimale tötliche Dosis und eine minimale krankmachende Dosis festzustellen. Dies schien mir zur Beurteilung der Verhältnisse sehr wichtig.

Tabelle II.

4tägige Bouillonkultur bei 37° gewachsen, dann durch Chamberland filtriert und im Vacuum bei 24° bis 31° eingeengt.

Taube Nr.	Körpergewicht gr	Injektionsmenge ccm	Injektionsmenge relative*) gr	Schlafsucht Beginn nach Minuten	Schlafsucht Ende nach Stunden
XVII	375	80	1 : 4½	15	† 11½
XVIII	296	50	1 : 6	15	† ca. 20
XIX	335	30	1 : 11	20—25	ca. 20–25
XX	322	20	1 : 16½	—	—

*) Unter „relativer Injektionsmenge“ verstehen wir das Verhältnis des ursprünglichen Chamberlandfiltrats zum Körpergewicht des Tieres (CF : KG) in Gramm ausgedrückt.

† Sektion zeigt keine pathologischen Veränderungen. Kulturen und Platten steril.

Tabelle III.

8tägige Bouillonkultur bei 37° gewachsen, dann durch Chamberland filtriert und im Vacuum bei 23° bis 29° eingeengt.

Taube Nr.	Körpergewicht gr	Injektionsmenge ccm	Injektionsmenge relative gr	Schlafsucht Beginn nach ca. Minuten	Schlafsucht Ende nach ca. Stunden
XXI	375	80	1 : $4^1/_2$	20	† 18
XXII	355	40	1 : 9	25	15
XXIII	310	30	1 : $10^1/_3$	25	8
XXIV	290	10	1 : 29	—	—

† Sektion: resultatlos. Kulturen: steril.

Tabelle IV.

26tägige Bouillonreinkultur bei 37° gewachsen, durch Chamberland filtriert und im Vacuum bei 28° bis 32° eingeengt.

Taube Nr.	Körpergewicht gr	Injektionsmenge ccm	Injektionsmenge relative gr	Schlafsucht Beginn nach ca. Minuten	Schlafsucht Ende nach ca. Stunden
XXV	380	80	1 : $4^3/_4$	60	5—6
XXVI	378	60	1 : $6^3/_4$	90	5
XXVII	347	40	1 : $8^3/_4$	90—100	4
XXVIII	347	20	1 : $17^1/_3$	$3^1/_2$ Stdn. ?	$3^3/_4$?

Aus diesen Versuchen ist zu ersehen, dass bei Rindfleischbouillonkulturen, die bei 37° gewachsen sind, mit 30 ccm ungefähr die niedrigste Grenze erreicht ist, bei der Schlafsucht an Tauben erzeugt werden kann. Die minimalste letale Dosis beträgt bei den 4tägigen Kulturen etwa 50 ccm, bei den 8tägigen liegt sie auch zwischen 40 und 80 ccm, und bei den 26tägigen tritt nur Schlafsucht auf. Ob der nach $3^1/_2$ Stunden auftretende und ca. 15 Minuten andauernde Zustand der letzten Taube wirkliche, durch Toxine bedingte Schlafsucht war, liess sich schwer entscheiden. — Die folgenden Tabellen zeigen, wie diese Verhältnisse bei den Kulturen waren, welche bei 42° verschieden lange Zeit gewachsen waren.

Tabelle V.

4tägige Bouillonreinkultur, bei 42° gewachsen, dann durch Chamberland filtriert und im Vacuum bei 28°—35° eingeengt.

Taube Nr.	Körpergewicht gr	Injektionsmenge ccm	Injektionsmenge relative gr	Schlafsucht Beginn nach ca. Minuten	Schlafsucht Ende nach ca. Stunden
XIV	345	80	1 : 4,25	10—15	† 30
XXIX	399	45	1 : 8,5	20	8
XXX	365	30	1 : 12	30	8
XXXI	350	20	1 : 17,5	—	—

† Bei der Sektion keine pathologische Veränderung. Plattenverfahren: negativ.

Tabelle VI.

8tägige Bouillonreinkulturen, bei 42° gewachsen, durch Chamberland filtriert und im Vacuum bei 29° bis 31° eingeengt.

Taube Nr.	Körpergewicht gr	Injektionsmenge ccm	Injektionsmenge relative gr	Schlafsucht Beginn nach ca. Minuten	Schlafsucht Ende nach ca. Stunden
XXXII	265	80	1 : 3½	20	27 † 13 Tagen
XXXIII	355	60	1 : 5½	25	8
XXXIV	365	30	1 : 12	30	6—7
XXXV	360	15	1 : 24	—	—

† Sektion und Kultur: negativ. Siehe Seite 19.

Tabelle VII.

27tägige Bouillonreinkultur, bei 42° gewachsen, durch Chamberland filtriert und im Vacuum bei 22° bis 35° eingeengt.

Taube Nr.	Körpergewicht gr	Injektionsmenge ccm	Injektionsmenge relative gr	Schlafsucht Beginn nach ca. Minuten	Schlafsucht Ende nach ca. Stunden
XXXVI	358	80	1 : 4½	?	?
XXXVII	360	60	1 : 6	?	?
XXXVIII	356	30	1 : 12	—	—
XXXIX	354	20	1 : 18	—	—

Auch diese Versuchsreihen führen uns vor Augen, dass bei 30 ccm ungefähr die minimale Dosis liegt, welche Tauben vorübergehend krank machen kann, zugleich zeigen sie aber auch, dass die ständige Temperatur von 42° einen weniger günstigen Einfluss auf die Toxinbildung der Bouillonkulturen ausübt, denn während 4tägige Kulturen von 37° noch den Tod von Tieren bei Mengen von 50 ccm, oder besser gesagt in dem Verhältnis von 1 Chamberlandfiltrat zu 6 Körpergewicht hervorruft, so sind bei den im 42° Brutschrank gewachsenen Kulturen ca. 80 ccm, oder 1 CF : 4¼ KG erforderlich; und während eine Taube von 375 gr nach Injektion von 80 ccm 8tägiger, aber bei 37° gewachsener Reinkultur innerhalb 18 Stunden stirbt (vgl. Tabelle III), verendet eine Taube von 265 gr nach Einverleibung gleichvieler, gleichalter, aber bei 42° gewachsener Kultur erst nach 13 Tagen (vgl. Tabelle VI), wobei noch in Betracht zu ziehen ist, dass letztere Taube 110 gr leichter war. Die 27tägige Kultur vollends erzeugte überhaupt kein typisches Bild, die Tiere waren nur weniger munter, wie die Kontrolltauben.

Alle diese Punkte bewogen uns dazu, die in den nächsten Tabellen verzeichneten Versuche mit Hühnerfleischbouillon nur mit solcher vorzunehmen, die nach der Impfung mit Bacterium avicidum in Brutschränken von 37° gestanden war.

Tabelle VIII.

4tägige Hühnerfleischbouillon, bei 37° gewachsen, im Chamberland filtriert und im Vacuum bei 30°—33° eingeengt.

Taube Nr.	Körpergewicht gr	Injektionsmenge ccm	Injektionsmenge relative gr	Schlafsucht Beginn nach ca. Minuten	Schlafsucht Ende nach ca. Stunden
XL	380	80	1 : 4¾	15	† 14—17
XLI	354	60	1 : 6	20	† 20
XLII	355	30—35	1 : 10–11	20—30	18
XLIII	372	25	1 : 15	20–30	10
XLIV	365	20	1 : 18¼	—	—

† Sektionen und Kulturen: resultatlos.

Tabelle IX.

8tägige Hühnerfleischbouillon, bei 37° gewachsen, im Chamberland filtriert und im Vacuum bei 24°—29° eingeengt.

Taube Nr.	Körpergewicht gr	Injektionsmenge ccm	Injektionsmenge relative gr	Schlafsucht Beginn nach ca. Minuten	Schlafsucht Ende nach ca. Stunden
XLV	380	80	1 : 4¾	10—15	† 17
XLVI	410	60	1 : 7	25	12—15
XLVII	365	40	1 : 9	20—25	8—10
XLVIII	347	25	1 : 14	?	?

† Sektion und Platten: negativ.

Um kurz anzugeben was uns diese Zahlen lehren, so sei bemerkt, dass also auch bei den Toxinen, die in Hühnerfleischbouillonkulturen gebildet werden, das Minimum zum Hervorrufen des Krankheitssymptoms um 30 ccm herum liegt. Auch der Tod wird bewirkt und zwar hier wie bei Kulturen von Rindfleischbouillon nach Injektion von 60 ccm bei den 4tägigen Kulturen, und 80 ccm bei den 8tägigen. Vierwöchentliche Kultur wurde nur in der Menge von 70—80 ccm einer Taube eingespritzt, das Tier genas nach einem schlafähnlichen Zustand.

Wenn ich durch diese Versuche auch die Gewissheit erlangt hatte, dass, wie oben gesagt, schon Dosen von 30 ccm 4 und 8tägiger Geflügelcholerakultur bei Tauben Schlafsucht zur Folge haben, so schien mir diese Menge doch noch ausserordentlich gross. Ich glaubte noch stärker wirkende, krankmachende Stoffwechselprodukte zu finden, wenn ich die Bakterienleiber selbst in den Tierkörper bringe – intracelluläre Gifte — natürlich in einer Form, in der sie keine Infektion nach sich ziehen konnten. Dem Beispiele von R. Pfeiffer folgend, verwandte ich Material, das von Agarkulturen abgeschabt war. Ich impfte eine Taube mit Bacterium avicidum, tötete sie in der Agone und gewann aus dem unter aseptischen Kautelen freigelegten Herzen Blut, welches nur den Infektionserreger barg. Hiervon legte ich Agar-Strichkulturen an und stellte dieselben in Brutschränke von 37° und 41,5°. Nach drei und acht Tagen nahm ich je 15 Agarkulturen, von deren Reinheit ich mich natürlich über-

zeugt hatte, und schabte mit einer Öse sowie einer geringen Menge steriler Bouillon oder steriler physiologischer Kochsalzlösung möglichst alle Kultur von der Agaroberfläche, gab alles so erhaltene Material in ein Reagenzglas und nahm soviel Bouillon oder Kochsalzlösung hinzu, bis es im ganzen 10 ccm Flüssigkeit waren. Die Bakterien wurden im Wasserbade von 58° während 15 Minuten abgetötet und intramuskulär oder subkutan Tauben eingespritzt. Die nächsten zwei Tabellen geben Aufschluss über Art und Weise, sowie Resultat der Impfungen.

Tabelle X.

Agarkulturen bei 37° gewachsen.

Taube Nr.	Körpergewicht gr	Alter der Kultur	Injektionsmenge ccm	Also Material von	Resultat der Impfung
XLIX	338	4 Tage	1,0	1½ Kult.	—
L	322	4 „	2,5	3–4 „	—
LI	319	4 „	6,5	ca. 10 „	—
LII	365	8 „	2,0	3 „	—
LIII	368	8 „	8,0	12 „	—

Tabelle XI.

Agarkulturen bei 41,5° gewachsen.

Taube Nr.	Körpergewicht gr	Alter der Kultur	Injektionsmenge ccm	Also Material von	Resultat der Impfung
LIV	324	4 Tage	2,5	3–4 Kult.	—
LV	335	4 „	7,5	11–12 „	—
LVI	342	8 „	2,0	3 „	—
LVII	348	8 „	8,0	12 „	—

Von diesen neun Tauben verhielt sich nach der Einverleibung der Bazillen keine so, dass man sie für schläfrig hätte halten können; sammt und sonders blieben sie gesund und am Leben.

Die Schuld, dass keines der Tiere Schlafsucht erhielt, führte ich darauf zurück, dass die injizierten Mengen zu klein waren. So grosse Quantitäten, als erforderlich sind, bekam ich auf die Weise, dass ich Bouillonkolben von 60 ccm mit drei Ösen Herzblut einer soeben verstorbenen Geflügelcholeratauben impfte und in Brutschränken wachsen liess. Die Bazillen, welche sich darin rasch und zahlreich vermehrten, tötete ich innerhalb 20 Minuten im Wasserbad von 58° ab und nachdem ich mehrere Kolben in ein steriles Gefäss ausgegossen hatte, engte ich die Flüssigkeit, also Bouillon plus Bazillen, im Vacuum bei niederer Temperatur (Maximum 34°) ein. Die Schale nahm ich erst heraus, wenn die ganze Substanz zu einem Pulver geworden war; ich nahm an, dadurch seien die Bakterien in ihrer Form verändert, desaggregiert, und infolgedessen wären die eventuellen intracellulären Gifte frei geworden. Mikroskopische Präparate bestätigten die Annahme von der Formveränderung der Bakterien, nur ganz wenige Exemplare in einem Gesichtsfelde besassen noch die typische Gestalt; dass ich mich vor dem Abtöten der Kultur von ihrer Reinheit und nachher von ihrer Sterilität überzeugt habe, braucht wohl nicht hervorgehoben zu werden. — Die nächsten Tabellen geben am besten Aufschluss darüber, wie wenig ich durch dieses Verfahren dem

Ziele näher rückte, mit geringen Kulturmengen des bacterium avicidum Schlafsucht oder Tod bei den Tauben zu erlangen.

Tabelle XII.

4 täge Bouillonkulturen, 20 Minuten bei 58° abgetötet, dann bei 32° im Vacuum eingeengt.

Kontrollkulturen: rein resp. steril.

Taube Nr.	Körpergewicht gr	Injektionsmenge ccm	Injektionsmenge relative gr	Schlafsucht Beginn nach ca. Minuten	Schlafsucht Ende nach ca. Stunden
LVIII	381	50—60	1 : 7½ 6⅓	5	† 22
LIX	312	30	1 : 10½	5—10	30?
				Am zweiten Tag Schlafsucht wenig ausgeprägt, doch auch kein normales Verhalten.	
LX	375	15	1 : 25	?	?
LXI	370	7,5	1 : 49⅓	—	—

† Kulturen aus Herzblut: steril.

Tabelle XIII.

8 tägige bei 37° gewachsene Bouillonkultur in 20 Minuten bei 57½° abgetötet, dann bei 28°—34° im Vacuum eingedampft.

Kontrollkulturen: rein resp. steril.

Taube Nr.	Körpergewicht gr	Injektionsmenge ccm	Injektionsmenge relative gr	Schlafsucht Beginn nach ca. Minuten	Schlafsucht Ende nach ca. Stunden
LXII	375	50	1 : 7½	10	30
				Am Tage nach der Impfung sichtlich krank, erholt sich aber wieder.	
LXIII	358	30	1 : 12	10	dasselbe wie oben
LXIV	354	20—25	1 : 14–18	?	?

Die ersten beiden Tauben in dieser letzten Versuchsreihe wurden auch die darauffolgende Zeit beobachtet. Nach 2—3 Wochen löste sich an der Impfstelle ein ca. zweimarkstückgrosser Hautteil ab. Derselbe war pergamentartig und an der unteren Fläche sass eine circa linsengrosse Granulation. Das Allgemeinbefinden der Tiere war gut. Die Gewichtsabnahme betrug nur einige Gramm und ist somit ohne Bedeutung. Die Schläfrigkeit dieser Tauben sowie der Taube LIX in Tabelle XII war am Tage nach der Impfung nicht so ausgeprägt, wie dies gewöhnlich der Fall war und sich in den ersten Stunden zeigt, jedoch kann man den Zustand, in den sie verfallen waren, auch nicht normal nennen. Es war ein Mittelding zwischen krankem und normalem Aussehen.

Im übrigen geht aus der Tabelle XII und XIII hervor, dass kein Unterschied von Bedeutung zwischen Bazillenfiltraten allein und durch Hitze abgetöteter Bouillon plus Bakterien besteht. Die minimale letale

Dosis liegt ungefähr bei 60 ccm, die minimale Dosis, um das bekannte Symptom zu erhalten, zwischen 25 ccm und 30 ccm. Scharfe Grenzen lassen sich selbstverständlich nie bestimmen. Es spielen zu sehr Zufälle mit in Bezug auf Alter, Nährzustand und Gewicht der Tauben und dergleichen.

Zum Abtöten der Bazillen war in den letzten Versuchen Hitze verwandt worden; trotzdem verhältnismässig mittlere Temperaturgrade (Maximum 58°) herangezogen wurden, also nach sonst gemachten Erfahrungen, die eventuellen intracellulären Gifte kaum hierbei vernichtet wurden, so lag doch immerhin die Möglichkeit vorhanden, dass durch die selbst gelinde Erwärmung die Stoffwechselprodukte gelitten hätten. Es war daher wünschenswert, eine weitere Reihe von Versuchen zu machen, in denen die Bazillen durch ein chemisches Mittel getötet wurden, welches jedoch die Stoffwechselprodukte und Fermente unberührt liess. Eine solche Substanz besitzen wir in dem Toluol, durch dessen Anwendung Ehrlich und Wassermann[6]) ihre Diphtherietoxine gewinnen konnten. Bei unseren Versuchen ging ich so vor: Erlenmayerkolben wurden mit 60 ccm Bouillon gefüllt, mit bacterium avicidum geimpft und in die Brutschränke gebracht. Nach vier und acht Tagen überzeugte man sich von der Reinheit der Kulturen und gab dann soviel Toluol zu der Bouillon, dass eine 2—3 mm hohe Schicht die Oberfläche derselben gleichmässig bedeckte. Die so gewonnene Flüssigkeit wurde mehrere Male im Tage tüchtig durchgeschüttelt und nach 48 Stunden über-

zeugten wir uns durch Übertragen geringer Mengen in grosse Bouillonquantitäten, dass die Bazillen der Vernichtung anheimgefallen sind. Wir gingen jetzt an die Einengung der Bouillontoluolgemenge ebenfalls wieder im Vacuum bei 24°—31°. Es ist klar, dass bei dem Eindampfen das Toluol mitverdampft.

Tabelle XIV.

5tägige Bouillonreinkultur bei 37° gewachsen, mit Toluol versetzt, und nach 2—3 Tagen im Vacuum bei 24°—31° eingeengt (Kontrollkulturen: steril).

Taube Nr.	Körpergewicht gr	Injektionsmenge ccm	Injektionsmenge relative gr	Schlafsucht Beginn nach ca. Minuten	Schlafsucht Ende nach ca. Stunden
LXV	385	80	1 : 5	5	23 Stirbt apoplektiform.
LXVI	375	50	1 : 7½	10	? Stirbt in der zweiten Nacht nach der Injektion.
LXVII	315	30	1 : 10½	30—40	? Desgleichen wie die vorhergehende.

† Sektionsbilder liefern keine Anhaltspunkte für einen andern Tod als durch Toxine. Die Platten aus Herzblut der beiden letzten Tauben liessen nur ganz vereinzelt Coli nachweisen, das post mortem eingedrungen sein wird.

Auffallend ist bei diesen Versuchen, dass im Gegensatz zu allen früheren, eine Taube nach Injektion des Restes von 30 ccm, in diesem Falle, wenn man die ursprüngliche Menge auf das Körpergewicht berechnet, dem zehnten Teil des Körpergewichts, einging. Die Schläfrigkeit begann bei den beiden ersten Tauben fast sofort nach der Einverleibung der auf ca. $2^1/_2$ ccm eingeengten Bouillonmengen, und war auch nach 12 Stunden sehr heftig, wenngleich ein kleines Geräusch genügte, um die Tiere auf Sekunden aufwachen zu lassen. Die mit dem eingeengten Rest von 30 und 50 ccm geimpften Tauben waren am Tag nachher fast kugelrund zusammengekauert. Bei den Sektionen fand ich, wie oben angeführt, keine pathologische Veränderung, ausser an der Impfstelle, wo sich das Gewebe graublau verfärbt hatte. Mikroskopische Präparate, Kultur und selbst das Tierexperiment lieferten keine greifbaren Resultate. Demnach müssen es die Toxine des bacterium avicidum gewesen sein, welche den Tod, auch bei der verhältnismässig geringen Menge von 30 ccm zur Folge hatten.

In den nun sich anschliessenden Tabellen gestatte ich mir, einen Überblick zu geben, wie gross die Bildung des narkotisierenden Bakterienproduktes bei Hühnerfleischbouillon ist, in der die ausgewachsenen Bazillen genau wie oben mit Toluol abgetötet waren. Ich habe hierbei nur die Verhältnisse bei vier- und achttägigem Wachstum bei 37° in Betracht gezogen, denn aus den Resultaten meiner bisherigen Versuche ging, wie schon oft betont, deutlich hervor, dass vier

und acht Tage die Zeit ist, bei der die betreffenden Gifte am wirksamsten sind. Die Reihen mit Kulturen bei 42° gewachsen, habe ich ganz weggelassen, denn die Arbeit würde dadurch im wesentlichen nicht gefördert. Auch höhere Dosen habe ich nicht in Anwendung gebracht, da es mir ja einerseits darauf ankam, in Erfahrung zu bringen, ob sich in der Hühnerfleischbouillon vielleicht Stoffe befinden, welche die toxische Wirkung des betreffenden Giftes steigern, andererseits es mir sehr erwünscht war, die minimale Dosis für eine vorübergehende Erkrankung festzustellen.

Tabelle XV.

4tägige bei 37° gewachsene Hühnerfleischbouillonkultur wird mit Toluol abgetötet, dann im Vacuum bei 31°—34° eingeengt und der Rest injiziert.

Taube Nr.	Körpergewicht gr	Injektionsmenge ccm	Injektionsmenge relative gr	Schlafsucht Beginn nach ca. Minuten	Schlafsucht Ende nach ca. Stunden
LXVIII	350	30	1 : 11⅔	20	15
LXIX	375	25	1 : 15	20 25	13- 15
LXX	380	20	1 : 19	?	—

Kontrollkulturen: rein resp. steril.

Tabelle XVI.

8tägige bei 37° gewachsene Hühnerfleischbouillonkultur wird mit Toluol abgetötet, dann im Vacuum bei 22°—29° eingeengt. Kontrollkulturen: rein resp. steril.

Taube Nr.	Körpergewicht gr	Injektionsmenge ccm	Injektionsmenge relative gr	Schlafsucht Beginn nach ca. Minuten	Schlafsucht Ende nach ca. Stunden
LXXI	368	30	1 : 12	15	20–22
LXXII	370	25	1 : 15	15—20	18—20
LXXIII	347	20	1 : 17½	—	—

Die Abtötung der Bazillen mit Toluol ergiebt also keine nennenswert besseren Resultate, wie die Abtötung mit Hitze. Man muss auch hier grosse Mengen eindampfen, sowohl um die Tiere schläfrig (25-30 ccm) zu machen, als auch um sie zu töten (ca. 70 ccm). Im Anschluss an diese Versuche schien es mir nicht uninteressant, zu erfahren, wie sich die Stoffwechselprodukte unseres Bakteriums höheren Wärmegraden gegenüber verhielten. Ich gab deshalb bestimmte Mengen Chamberlandfiltrat resp. mit Toluol behandelter Kultur in Schalen, engte sie im Vacuum ein und gab, nachdem ich durch eine sterile Pravazsche Spritze mit weiter Kanüle die Menge des Filtratrestes bestimmt hatte, soviel sterile Bouillon hinzu, bis 1 ccm

der Substanz 20 ccm ursprünglicher Flüssigkeit entsprach; dann gab ich mehrere Kubikcentimeter in ein sterilisiertes Centrifugierröhrchen und stellte dasselbe in das Wasserbad. Nach entsprechend langer Einwirkung der betreffenden Temperatur auf das Material wurden genau $2^1/_2$ ccm in einer Spritze steril aspiriert und einer Taube unter die Haut oder in den Brustmuskel gegeben, und zwar erhielt:

Taube LXXIV, 349 gr schwer, $2^1/_2$ ccm, also 50 gr Filtrat einer viertägigen 37° Bouillonkultur nach Einengung im Vacuum 15 Minuten lang im 65° Wasserbad gelassen. Die Schlafsucht trat erst nach einer Stunde auf und dauerte circa zehn Stunden. Kontrolle: Tabelle II.

Taube LXXV, 339 gr schwer, erhielt 50 ccm fünftägiger bei 37° gewachsener Reinkultur nach Toluolbehandlung und Einengung im Vacuum 10 Minuten im Wasserbad von 80° gelassen. Schlafsucht tritt nach circa zwei Stunden auf und dauert ungefähr drei Stunden. Kontrolle: Tabelle XIV.

Taube LXXVI, 342 gr schwer, erhält 60 ccm der gleichen Flüssigkeit wie die vorhergehende, jedoch bei 100° während 10 Minuten erwärmt. Die Taube zeigt nach 2—3 Stunden ein verändertes Aussehen, doch ist dasselbe nicht gut als Schlafsucht anzusprechen. Kontrolle: Tabelle XIV.

Da ich diese Versuche mit Material ausführte, das ich auch zu den oben näher angegebenen Versuchsreihen verwandte, so hatte ich eine sehr gute Kontrolle und somit den Beweis, dass das durch das bacterium

avicidum in seinen Bouillonkulturen erzeugte Gift durch 10 resp. 15 Minuten lange Einwirkung von 80° resp. 65° eine Einbusse an seiner Wirkung erleidet, welche durch Erwärmen auf 100° nach 10 Minuten fast vollständig erlischt.

Eine Frage ist bisher noch nicht berührt worden: Produziert das bacterium avicidum im tierischen Organismus eher und mehr Toxine, als in den künstlichen Kulturen?

Um auch diese Möglichkeit zu studieren, entschlossen wir uns zu einer Reihe von Versuchen mit Exsudaten solcher Tiere, welche infolge Infektion mit genanntem Erreger erkrankten und in der Agone getötet oder eben erst gestorben waren. Roux und Chamberland[7]) waren es, welche nachwiesen, dass die Exsudate und die Gewebssäfte von Meerschweinchen, welche an malignem Ödem verendet waren, nach vorausgegangener Entfernung der Erreger bei Tieren Vergiftungssymptome des malignen Ödems hervorriefen. Meerschweinchen, denen Chamberlandfiltrate solcher Exsudate injiziert wurden, starben nach mehreren Stunden. Im gleichen Jahre veröffentlichte Roux[8]) die Thatsache, dass auch mit filtriertem Muskelsaft von Tieren, die an Rauschbrand verendet waren, bei Meerschweinchen ein Symptomenkomplex schwerer Erkrankung zu erzeugen ist. Darnach schien es uns vielleicht nicht aussichtslos, wie oben gesagt,

[7]) Roux u. Chamberland: Annales de l'Inst. Past. 1887, Band I.

mit Hilfe von Geflügelcholeraexsudaten Schlafsucht oder gar den Tod bei Tauben herbeizuführen. Freilich war zu berücksichtigen, dass man grössere Mengen von Flüssigkeit brauchte, sollte man zu einem günstigen Resultate gelangen. Kaninchen, die ja sehr schnell an Infektion mit bacterium avicidum eingehen, liefern bei intraperitonealer Impfung — und bloss auf solche konnte es bei unsern Versuchen ankommen — höchstens 3 ccm, eine Menge, mit der wenig anzufangen war. Als dasjenige Versuchstier, aus dessen Peritonealhöhle mehr seröse Flüssigkeit zu gewinnen ist, gilt das Meerschweinchen. Da dasselbe aber für Geflügelcholera wenig empfänglich ist, so musste man sich erst überzeugen, ob es überhaupt in Betracht gezogen werden kann. Bekanntlich hat eine subkutane Injektion hochvirulenter Geflügelcholerakultur beim Meerschweinchen nur Abscessbildung zur Folge. Allerdings bleiben, wie schon Pasteur erwähnt hat, darin die Bazillen sehr infektionstüchtig. Wir durften also erwarten, dass sie auch hier Stoffwechselprodukte bilden und injizierten deshalb einem Meerschweinchen von 310 gr einen Kubikcentimeter 24 stündiger Bouillonreinkultur in die Bauchhöhle, nach 23 Stunden war das Tier tot. Im Blut und in den Organen waren die Geflügelcholerabazillen nachzuweisen, im Peritonealraum fand sich ein Exsudat. In den mikroskopischen Präparaten hiervon lagen die typischen Stäbchen dicht aneinander gelagert, zu hunderten in jedem Gesichtsfeld. Die Virulenz dieser Flüssigkeit wurde durch Impfung einer Kontrolltaube erwiesen, welche

prompt erlag. Nachdem dieser Orientierungsversuch günstig ausgefallen war, konnte man weitere Impfungen veranstalten. Die Meerschweinchen erhielten intraperitoneal 0,5 ccm 24stündiger Bouillonreinkultur in die Bauchhöhle und nach 20—23 Stunden konnte man sie, in den letzten Zügen liegend, töten und sezieren. Die Exsudatmassen betrugen durchschnittlich 6–8 ccm; sie wurden mit sterilen Pipetten oder Pravazspritzen ohne Kanüle entnommen und sofort in sterilen Gläsern mit Toluol versetzt, bis eine ca. 2 mm hohe Schicht darüberlag. Während der nächsten Tage wurden sie von Zeit zu Zeit geschüttelt und wieder in den Eisschrank gestellt. Nachdem ich durch Impfung in Bouillon festgestellt hatte, dass alle Keime abgetötet waren, konnte man das Desinfiziens entfernen. Dies geschah so, dass wir das ganze Gemenge in eine sterilisierte Burette brachten, deren unteres Ende, durch einen Wattebausch befestigt, in ein keimfreies Erlenmayerkölbchen hineinragte. Nach dem Eingiessen der zur Verarbeitung bestimmten Menge wurde die Burette mit Watte verschlossen und dann solange gewartet, bis das leichtere Toluol sich oben angesammelt hatte. Die untere Flüssigkeit, also nur Exsudat, wurde dann in den Erlenmayer abgelassen und Tauben eingespritzt. Leider führte auch dieses Verfahren zu keinen Resultaten, wie wir sie erwünschten und erhofften. Ohne irgend welche Störung ihrer Gesundheit ertrugen die Tauben die Exsudate.

Tabelle XVII.

Versuche mit Meerschweinchenexsudaten, mit Toluol abgetötet.

Taube Nr.	Körpergewicht gr	Erhält ccm	Verhalten nach der Injektion
LXXVII	295	0,5	völlig normal
LXXVIII	327	1,0	„ „
LXXIX	336	2,0	„ „
LXXX	339	2,5	„ „
LXXXI	342	5,0	„ „
LXXXII	324	10,0	„ „
LXXXIII	335	20,0	„ „

Taube LXXXIV, 344 gr schwer, welche 3,75 ccm Kaninchenexsudat, das mit Toluol wie die vorigen behandelt war, erhielt, zeigte ebensowenig eine Schläfrigkeit, wie die in der Tabelle angeführten.

Trotz dieser negativen Befunde wollte ich den Punkt, ob im Tierkörper eher giftige Stoffwechselprodukte des Geflügelcholerabakteriums erzeugt werden, weiter studieren. Wir bedienten uns hierzu permeabler Membranen, die wir mit Bouillon gefüllt und mit Geflügelcholerabazillen geimpft den Tieren einbrachten. Bezüglich der Herstellung dieser Membranen hielt ich mich an eine gleichfalls im Institut für Hygiene und Bakteriologie zu Strassburg auf Anregung von Herrn Professor E. Levy ausgeführte

Arbeit von H. Conradi[9]), der nach dem Vorbilde von Roux, Salimbeuy, Metschnikoff und seiner Schule[10]) Schilfsäcke (von Phragmites comm.) zum Studium der Giftbildung beim Milzbrandbazillus anwandte. Diese Schilfsäcke wurden mit Bazillen bis zu 4 ccm gefüllt und dann mit bacterium avicidum geimpft. Hierauf wurden die Tauben laparatomiert. Zu dem Zwecke wurden am Abdomen und an der Brust die Federn entfernt, die Taube alsdann auf eines der für Kaninchen gebräuchlichen Operationsbretter gespannt und das Operationsfeld gründlich desinfiziert; unter aseptischen Kautelen wurde das Peritoneum und die Därme freigelegt, und die Schilfsäcke in die Bauchhöhle gegeben. Dann wurde das Peritoneum und schliesslich die Muskulatur durch fortlaufende Naht genäht. Ein Verband wurde durch Kollodium ersetzt. Nur eine Taube starb während der Operation, die anderen überstanden dieselbe gut. Die Heilung erfolgte per primam. Auf solche Weise erhielten einzelne Tauben (LXXXV bis XCIV) ein Schilfsäckchen, andere zwei, wiederum andere vier in die Bauchhöhle. Bildeten die sich vermehrenden Bazillen in diesen Versuchen lösliche, giftige Stoffwechselprodukte, wie die französischen Autoren am Beispiel des Choleravibrionen beobachteten, so vermochten diese löslichen Toxine die permeable Membran des Schilfsackes zu durchwandern, das Tier vergiften, während die Bakterienleiber im

[9]) H. Conradi, Inauguraldissertation, Strassburg, 1899.

[10]) Podbelsky, Annales de l'Inst. Past., 1898, Band XII.

Säckchen zurückblieben. Aber auch diese Experimente sind samt und sonders negativ geblieben, wir beobachteten die Tiere tage-, sogar wochenlang, ohne dass die geringste Störung ihres Allgemeinbefindens sich zeigte.

Wenn ich zum Schluss meiner Arbeit nochmal kurz zusammenfassen darf, so komme ich zu folgenden Resultaten:

Das Bacterium avicidum bildet ein lösliches Gift, welches in die Kulturflüssigkeit übergeht. Dieses Gift ist jedoch nur in so minimalen Mengen vertreten, dass ganz gewaltige Quantitäten nötig sind, um das Geflügel schlafsüchtig zu machen. Diese bereits von Pasteur gefundene hochwichtige Thatsache fand in meinen Versuchen nur Bestätigung. Ich kann dieselbe jedoch insofern erweitern, dass noch grössere Dosen den Tod von Tauben nach sich ziehen.

Die Bakterienleiber enthalten in nennenswerter Weise dieses Gift nicht.

Auch bei der Geflügelcholera tritt nach wie vor das Moment der Infektion gegenüber demjenigen der reinen Intoxikation, wie wir sie z. B. beim Tetanus vor uns haben, noch immerhin in den Vordergrund.

Es imponiert die masslose Vermehrung der Bakterien, welche den ganzen Organismus überschwemmen, nichtsdestoweniger aber müssen wir,

wie wir gesehen, mit der Giftwirkung rechnen. Dieselbe tritt jedoch nur dann ein, wenn enorme Mengen von Bazillen herangewachsen sind.

Den Anstoss zur Krankheit vermögen überaus wenig Exemplare des Erregers zu geben, in unsern Versuchen die subkutane oder intramuskuläre Einverleibung von 1—6 Bakterien.

Litteratur.

1. Pasteur: Comptes rendues de l'academie des sciences, 1880, S. 1030.
2. E. Levy und Klemperer: Grundriss der klinischen Bakteriologie, II. Auflage, 1900.
3. R. Pfeiffer: Deutsche med. Wochenschrift, 1894, Nr. 48. Über die spezifische Immunitätsreaktion der Typhusbazillen.
4. Kitt: Über Wert und Unwert der Schutzimpfung.
5. A. Schönwerth: Archiv für Hygiene, 1893, Band XVIII. Abhängigkeit der erfolgreichen Infektion mit Hühnercholera von der Anzahl der dem Tiere einverleibten Bazillen.
6. Ehrlich und Wassermann: Zeitschrift für Hygiene, Band XVIII. Über Diphtherieantitoxine.
7. Roux und Chamberland: Annales de l'Institut Pasteur, 1887, Band I, Nr. 12. Immunité contre la septicémie, conterée par des substances solubles.
8. Roux: ebenda.
9. Conradi: Inauguraldissertation, Strassburg, 1899. Zur Frage der Toxinbildung des Milzbrandbazillus.
10. Podbelsky: Annales de l'Institut Pasteur, Band XII, 1898. Immunité contre le bacillus subtilis.